昆虫学报 *Acta Entomologica Sinica*，August 2003，46（4）：436－440 ISSN 0454-6296

家蚕体内因缺乏维生素 B_6 而引起的若干代谢变动

张剑韵，黄龙全
（安徽农业大学蚕业丝绸系，合肥 230036）

摘要：采用不含桑叶粉末、以去维生素牛乳酪蛋白为蛋白源的准合成饲料饲育家蚕 *Bombyx mori* 5 龄幼虫，探讨了缺乏维生素 B_6（VB_6）对蚕体氨基酸代谢、脂肪酸代谢以及转氨酶活力的影响。缺乏 VB_6 引起支链氨基酸分解代谢受阻，幼虫体液中大量积累亮氨酸、缬氨酸和异亮氨酸。同时因绢丝腺发育停滞，丝氨酸也在体液中积累。另一方面，缺乏 VB_6 幼虫体液中赖氨酸、脯氨酸、精氨酸、甲硫氨酸和谷氨酸含量减少，其中赖氨酸尤为突出。推测缺乏 VB_6 引起赖氨酸分解代谢亢进。结果还表明，缺乏 VB_6 幼虫体内脂肪酸代谢异常，谷丙转氨酶活力显著低下。

关键词：家蚕；准合成饲料；缺乏维生素 B_6；氨基酸代谢；脂肪酸代谢
中图分类号：Q966 **文献标识码**：A **文章编号**：0454-6296（2003）04-0436-05

Effects of vitamin B_6 deficiency on the amino acid metabolism，fatty acid metabolism and aminotransferase activity of the silkworm，*Bombyx mori*

ZHANG Jian-Yun，HUANG Long-Quan（Department of Sericulture and Silk，Anhui Agricultural University，Hefei 230036，China）

Abstract: The effects of vitamin B_6（VB_6）deficiency on the amino acid metabolism，fatty acid metabolism and aminotransferase activity of the silkworm，*Bombyx mori*，were studied in newly ecdysed 5th instar larvae reared on a semisynthetic diet that contained no mulberry powder and in which vitamin-free casein was the protein source. Under VB_6-deficient conditions，larval growth was retarded，the catabolism of branched chain amino acid（leucine，valine，isoleucine）was inhibited，and lysine catabolism was stimulated. The leucine，valine，isoleucine and serine content in haemolymph were markedly increased by VB_6 deficiency. Conversely，lysine，proline，arginine，methionine and glutamine content decreased，especially markedly in lysine. The lack of dietary VB_6 also inhibited synthetic metabolism of fatty acids and reduced the activity of glutamic-pyruvic transaminase.

Key words: *Bombyx mori*；semisynthetic diet；vitamin B_6 deficiency；metabolism of amino acid and fatty acid

水溶性维生素 B_6（VB_6）以磷酸吡哆醛的形式，作为催化转氨基反应、消旋作用、脱羧基反应以及置换反应等百种以上酶的辅酶在生物体内发挥作用。VB_6 不仅参与氨基酸代谢，而且与转 1 碳单位反应、多烯脂肪酸代谢等也有密切的关系。

VB_6 对昆虫来说是一种必需维生素。用缺乏 VB_6 的饲料饲育家蚕 *Bombyx mori* 各龄起蚕，幼虫生长发育停滞，当龄死亡（Watanabe *et al*.，1971）。VB_6 的要求量随饲料蛋白质含量的增减而相应变化（Hamano and Okano，1989）。人工饲料中 VB_6 的最小添加量为每克粉体饲料 3 μg，而通常添加量为 30 μg（Horie and Ito，1963，1965；Horie *et al*.，1966）。

与营养要求性相比较，昆虫体内 VB_6 的生理机制很少被研究。Sundaram 和 Sarma（1962）报道，缺乏 VB_6 引起稻蛾幼虫体内色氨酸代谢受阻。Horie和 Watanabe（1983）报道，缺乏 VB_6 引起家蚕幼虫体液蛋白质含量下降，游离氨基酸含量增加，尿酸的排泄量也显著增加。我们采用不含桑叶粉末、以去维生素牛乳酪蛋白为蛋白源的准合成饲料饲育家蚕 5 龄幼虫，探讨了家蚕幼虫体内缺乏维生素 B_6 与氨基酸代谢、脂肪酸代谢以及谷丙转氨酶

作者简介：张剑韵，女，1959 年 11 月生，博士，副教授，研究方向为昆虫生理生化，E-mail：jianyun218@yahoo.com.cn
收稿日期 Received：2002-05-30；接受日期 Accepted：2003-01-07

活力的变动关系。

1　材料和方法

1.1　蚕品种和饲育方法

蚕品种、试验饲料组成、饲育方法和蚕体组织中磷酸吡哆醛的定量分析同张剑韵和黄龙全(2003)。饲料中合成盐酸吡哆醇（PN-HCl）的添加量为每克粉体饲料 30 μg，缺乏 VB_6 饲料则不添加盐酸吡哆醇。

1.2　体液游离氨基酸组成分析

分析装置为具有 UV 检出器和自动注入功能的 Waters PICO-TAG 高速氨基酸自动分析系统 LC-Module Ⅰ（Millipore 公司）。分离柱为 PICO-TAG（3.9 mm I.D.×30 cm），保持温度 51℃。诱导化装置为 PICO-TAG™工作站，数据解析采用 Waters™ 805 数据站。流动相 A（Eluent A）为去离子水-甲醇-三乙醇胺（2∶2∶1），流动相 B（Eluent B）为去离子水-甲醇-CH_3CN（40∶15∶45）。检出波长为 254 nm。

取幼虫体液 0.5 mL 放入小型离心管中，加入 200 μL 2 mmol/L 的内标物（n-leu）和 0.5 mL 80 g/L $HClO_4$，0℃ 10 000 r/min 离心 15 min 去蛋白。上清液移入另一支试管中，调整 pH 至 7.0，再度离心去盐。所得上清液中加入 100 μL 2 mol/L HCl 后，用去离子水定容 2 mL，再经孔径 0.45 μm 的过滤器过滤。取过滤液 20 μL 放入样品管中，在 PICO-TAG™工作站中减压干燥，恢复常压后加入洗液（甲醇∶去离子水∶三乙醇胺＝2∶2∶1）10 μL，再行减压干燥。然后加入反应液（甲醇∶去离子水∶三乙醇胺∶苯异硫氰酸＝7∶1∶1∶1）20 μL，充分混合后常压下反应 20 min，再行减压干燥。加入 100 μL PICO-TAG 稀释液，充分搅拌后移入微量瓶中，分析注入量为 5 μL。根据内标物（n-leu）与各种氨基酸峰面积的比值计算幼虫体液中游离氨基酸的含量。

另取除去蛋白质的幼虫体液 50 μL，加入 2% 甲醛 0.4 mL 及 6 mmol/L $FeCl_3$ 和 10%三氯乙酸的混合液 0.2 mL，在 105℃的条件下密闭加热 60 min。冰浴中冷却，用 10% 三氯乙酸定容至 5 mL，经 1 000 r/min 离心 10 min 后分为油层和水层。经过这样的处理，色氨酸转变成荧光物质 norharman。在激发波长 373 nm，荧光波长 452 nm 的日立 203 荧光光度计上测定水层的荧光强度。同时，用标准色氨酸溶液制作检量线，计算体液中色氨酸的含量。

1.3　脂肪体组织中脂肪酸组成分析

气相色谱仪为岛津 GC-14A（FID），数据处理仪为岛津 C-R6A。分离柱采用 CBR20-M25-025（75 cm×0.25 mmϕ df 0.25 μm，fused silica），分离柱保持温度、样品注入温度和检测温度均为 230℃。运送气体 N_2 60 mL/min，补充气体 N_2 25 mL/min，分配比例 1∶50。

取附有皮肤和肌肉层的脂肪体组织 200 mg，加入氯仿-甲醇等量混合液 5 mL，破碎匀浆，2 000 r/min 离心 10 min。上清液移入试管中，残渣再进行两次抽提，合并上清液，定容 15 mL。经滤纸过滤后，取 1 mL 放入罗口试管中，加 1 mL 内标物廿烷醇溶液（1 g/L 氯仿-甲醇混合液）。蒸发器中浓缩干燥后，加入甲醇性 5%盐酸 1 mL，盖上罗帽，在 100℃的条件下进行 60 min 的甲基化反应。恢复室温后，加入蒸馏水 0.5 mL 和己烷 2 mL，经 30 min 振动搅拌后离心 10 min。上清液移入另一支试管，残渣用己烷再进行两次抽提，合并上清液，蒸发器中浓缩干燥后加入丙酮 25 μL，分析注入量为 2 μL。脂肪酸的比感度测定采用含十六烷酸（18.5%）、十八烷酸（19.4%）、油酸（20.2%）、亚油酸（20.9%）和亚麻酸（21.0%）五种脂肪酸甲酯的定量用标准混合试剂。

1.4　脂肪体组织谷丙转氨酶活力的测定

冰浴中解剖幼虫，取附有皮肤和肌肉层的脂肪体组织 1 g，加入 5 mL 80 mmol/L 磷酸缓冲液（pH 7.4），冰浴中破碎匀浆，0℃ 10 000 r/min 离心 15 min。取上清液，经适当稀释后用 GPT-UV 检测组合试剂（日本和光纯药公司制品）测定其谷丙转氨酶活力。样品中蛋白质定量采用 Lowry 法。

2　结果

2.1　试验饲料的效果

摄食添加 VB_6 准合成饲料的幼虫生长发育良好，能够正常结茧、化蛹、羽化；而摄食未添加 VB_6 试验饲料的幼虫，4 日后体重的增加和绢丝腺的发育几乎停止，陆续死亡。另一方面，摄食未添加 VB_6 试验饲料的幼虫体内辅酶型 VB_6（磷酸吡哆醛）的含量仅为正常生长发育幼虫的 1/3（表 1）。

表1 家蚕5龄3日幼虫体内辅酶型 VB_6（磷酸吡哆醛）的含量（nmol/g 鲜重）

Table 1 The pyridoxal 5′-phosphate content of various organs on the 3rd day in the 5th instar of *B*. *mori*（nmol/g fresh weight）

饲料中的盐酸吡哆醇 PN-HCl in the diet	中肠 Midgut	脂肪体和皮肤肌肉 Fat body with muscle and skin	丝腺 Silk gland	马氏管 Malpighian tube
未添加 omitted	0.75±0.15	3.08±0.42	1.17±0.21	12.02±1.32
添加 added	1.63±0.25	8.99±1.01	4.07±0.92	25.46±4.05

数据为平均值±*SD*（*n*=3）。The values were indicated by mean±*SD*（*n*=3）.

2.2 幼虫体液游离氨基酸组成的变化

一般认为家蚕体液的游离氨基酸组成随虫体发育而变化，同时因饲料蛋白源的不同而改变。试验所用酪蛋白的氨基酸组成中，含量较高的是谷氨酸和脯氨酸，其他氨基酸分布均匀。用酪蛋白调制的正常饲料区幼虫体液中组氨酸、赖氨酸和甘氨酸等含量较高（表2），与桑叶育5龄幼虫体液游离氨基酸组成基本一致（Inokuchi and Yoshitake，1978）。

缺乏 VB_6 饲料区幼虫体液游离氨基酸总量较对照增加一倍。其中大量增加的是亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和丝氨酸。四种氨基酸含量合计为游离氨基酸总量的70%以上。亮氨酸、异亮氨酸和缬氨酸是蚕体不能合成的三种支链氨基酸。

另一方面，缺乏 VB_6 引起幼虫体液中赖氨酸、脯氨酸、精氨酸、甲硫氨酸和谷氨酸含量减少，其中显著减少的是赖氨酸。

组氨酸是正常幼虫体液中含量最高的游离氨基酸，蚕体既不能合成也不能分解组氨酸（钱惠田，1995）。体液中组氨酸含量也没有因为缺乏 VB_6 而显著变化。

2.3 脂肪体组织中脂肪酸组成的差异

试验饲料中 VB_6 的添加与否，也引起幼虫脂肪体组织中脂肪酸含量发生明显的变化（表3）。缺乏 VB_6 幼虫体内的五种脂肪酸（十六烷酸、十八烷酸、油酸、亚油酸和亚麻酸）含量均为正常生长发育幼虫的一半左右，其中以十六烷酸和油酸的减少最为显著。并且，脂肪酸含量的降低在5龄第3日就已经明显地表现出来。

表2 家蚕5龄5日幼虫体液中游离氨基酸的组成（mmol/mL 体液）

Table 2 Concentrations of free amino acid in the hemolymph on the 5th day in the 5th instar of *B*. *mori*（mmol/mL hemolymph）

氨基酸 Amino acid	酪蛋白 Casein (mg/g protein)	对照 Control	缺乏 VB_6 幼虫 VB_6 deficient larvae
天门冬氨酸 Asp	73	0.19±0.02	0.13±0.02
谷氨酸 Glu	220	3.70±0.43	1.83±0.39
丝氨酸 Ser	54	11.19±1.28	48.91±7.05
甘氨酸 Gly	19	28.63±2.03	31.96±5.11
组氨酸 His	31	225.45±4.58	189.44±12.2
苏氨酸 Thr	43	2.80±1.19	2.54±0.56
丙氨酸 Ala	31	8.26±1.43	6.07±0.11
精氨酸 Arg	38	9.86±1.02	2.45±0.48
脯氨酸 Pro	120	15.71±0.99	1.51±0.61
酪氨酸 Tyr	58	1.21±0.17	1.00±0.52
缬氨酸 Val	70	17.68±3.03	229.92±16.2
甲硫氨酸 Met	31	10.65±0.68	4.85±0.69
异亮氨酸 Ile	56	5.68±0.39	108.44±18.4
亮氨酸 Leu	97	10.86±1.10	268.03±34.1
苯丙氨酸 Phe	53	2.20±0.54	2.37±0.69
赖氨酸 Lys	83	70.54±8.97	7.24±1.60
半胱氨酸 Cys	5	t	t
色氨酸 Trp		0.20±0.01	0.11±0.02
总量 total	1 082	423.70	899.73

数据为平均值±*SD*（*n*=3），t为痕迹量。Data are mean±*SD*（*n*=3），t=trace.

表3 家蚕5龄幼虫脂肪体组织中的脂肪酸组成（mg/g）

Table 3 Content of fatty acids in the fat body with muscle and skin during the 5th instar of *B*. *mori*（mg/g）

脂肪酸 Fatty acid	对照 Control		缺乏 VB_6 幼虫 VB_6 deficient larvae	
	第3日 3rd-day	第5日 5th-day	第3日 3rd-day	第5日 5th-day
十六烷酸 palmitic acid	7.97±0.32	15.15±1.99	5.09±1.20	6.26±0.45
十八烷酸 stearic acid	1.84±0.08	1.89±0.00	1.11±0.06	1.22±0.09
油酸 oleic acid	9.48±0.75	15.14±2.31	6.56±1.41	8.09±0.73
亚油酸 linoleic acid	8.42±0.23	12.89±0.61	6.33±0.52	6.86±0.22
亚麻酸 linolenic acid	1.72±0.45	2.08±0.05	1.02±0.08	1.08±0.04
总量 total	29.43	47.15	20.11	23.50

数据为平均值±*SD*（*n*=3）。The values were indicated by mean±*SD*（*n*=3）.

2.4　脂肪体组织中谷丙转氨酶活力的变动

正常生长发育的幼虫脂肪体组织具有很强的谷丙转氨酶活性，从5龄第3日到第7日酶活力迅速上升。缺乏 VB_6 饲料区幼虫体内谷丙转氨酶活力显著降低，5龄日数增加后，酶活力也几乎没有变化（图1）。

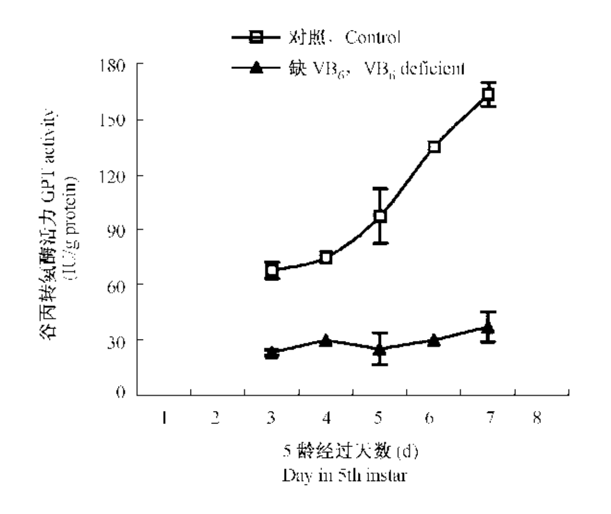


图1　家蚕5龄幼虫脂肪体组织中谷丙转氨酶活力的变动

Fig. 1　Changes of glutamic-pyruvic transaminase（GPT）activity in the fat body with muscle and skin during the 5th instar of *B. mori*

3　讨论

家蚕的必需氨基酸种类与其他昆虫和高等动物没有多大的差异。家蚕是大型泌丝昆虫，进入5龄后，以绢丝蛋白的合成为代谢中心。家蚕组织器官间的物质转送通过体液进行，体液游离氨基酸的组成反映了蚕体氨基酸和蛋白质的代谢状况。

5龄起蚕开始摄食缺乏 VB_6 饲料的幼虫生长发育停滞，体液游离氨基酸含量增加。游离氨基酸组成变化的最大特点是支链氨基酸的大量积累。作为饲料蛋白源而采用的酪蛋白氨基酸组成中，支链氨基酸含量为20%。摄食添加 VB_6 试验饲料的幼虫生长发育正常，其体液中支链氨基酸含量为8%左右；而缺乏 VB_6 幼虫体液中支链氨基酸含量高达60%以上。生物体内三种支链氨基酸不论是在分解或合成途径上都十分相似。动物体内的分解代谢，首先在以磷酸吡哆醛为辅酶的支链氨基酸转氨酶的作用下，生成相应的 α-酮酸，然后进行氧化脱羧。人类有称为槭糖尿症的遗传病，患者尿中出现与三种支链氨基酸相应的 α-酮酸和少量的支链氨基酸，病因是患者体内 α-酮酸脱羧酶缺陷所致（沈仁全等，1980）。家蚕有一种隐性遗传的臭蚕，蚕粪恶臭，幼虫在化蛹前死亡。臭蚕体内氨基酸代谢异常，最显著的变化是体液中三种支链氨基酸大量积累（Inokuchi and Yoshitake，1978）。臭蚕是先天性支链氨基酸代谢异常。而缺乏 VB_6 引起蚕体支链氨基酸分解代谢受阻。同时推测，家蚕支链氨基酸代谢异常的受损部位是支链氨基酸转氨酶。

缺乏 VB_6 还引起幼虫体液中丝氨酸积累。丝氨酸虽然是绢丝蛋白的主要构成氨基酸，但其主要合成部位不是绢丝腺，而是脂肪体。丝氨酸除了可以从甘氨酸合成外，还可以从糖代谢的中间产物3-磷酸甘油酸生成。很显然，体液中丝氨酸的异常积累主要是因为绢丝腺发育停滞而引起的。

赖氨酸是正常生长发育幼虫体液的主要游离氨基酸，含量为16%左右。而缺乏 VB_6 幼虫体液的赖氨酸含量减少到不足1%。赖氨酸和苏氨酸与其他氨基酸不同，分解途径不通过转氨作用，因此不受缺乏 VB_6 的影响。并且推测缺乏 VB_6 幼虫体内赖氨酸的分解代谢出现亢进。

家蚕正常生长发育幼虫5龄期大量合成十六烷酸和油酸（钱惠田，1995）。缺乏 VB_6 幼虫体内的亚油酸、亚麻酸、十六烷酸、十八烷酸和油酸含量均大幅度低于对照。这表示缺乏 VB_6 也引起蚕体脂肪酸代谢异常，其中以十六烷酸和油酸的合成代谢受阻最为明显。

转氨基作用是一个重要的生化反应，作为沟通蛋白质和糖代谢的桥梁，合成非必需氨基酸。家蚕体内转氨基反应以丙酮酸→丙氨酸最为活跃。脂肪体是蛋白质合成代谢旺盛的组织，具有很高的丙氨酸氨基转移酶活力。缺乏 VB_6 幼虫体内谷丙转氨酶活力显著降低。

缺乏 VB_6 对家蚕体内物质代谢的影响是通过 VB_6 要求性酶活力的降低而起作用的。缺乏 VB_6 首先影响氨基酸代谢，氨基酸代谢异常又以支链氨基酸分解代谢受阻最为显著，其次是赖氨酸分解代谢亢进。氨基酸代谢异常必然引起蚕体蛋白质合成受阻，这包括体蛋白和酶蛋白。缺乏 VB_6 引起家蚕幼虫生长发育停滞、死亡的原因，应该理解为是多种代谢异常的综合结果。

致谢　本研究主要工作在日本国立岐阜大学农学部食品营养学研究室完成，感谢栢植治人和早川享志

先生的大力支持。

参 考 文 献 (References)

Hamano K, Okano T, 1989. Effect of dietary levels of protein and pyridoxine on growth of younger larvae of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 58: 203-208 (in Japanese with English abstract).

Horie Y, Ito T, 1963. Vitamin requirement of the silkworm. *Nature*, 197: 98-99.

Horie Y, Ito T, 1965. Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* - Ⅹ. Vitamin B requirements and effects of several analogues. *J. Insect Physiol.*, 11: 1 585-1 593.

Horie Y, Watanabe K, Ito T, 1966. Nutrition of the silkworm, *Bombyx mori* - ⅩⅣ. Further studies on the requirements for B vitamins. *Bull. Seric. Exp. Stn. Japan*, 20: 393-409 (in Japanese with English abstract).

Horie Y, Watanabe K, 1983. Effects of dietary pyridoxine on larval growth, free amino acid pattern in haemolymph and uric acid excretion in the silkworm, *Bombyx mori*. *Insect Biochem.*, 13 (2): 205-212.

Inokuchi T, Yoshitake N, 1978. Abnormality of amino acid metabolism in the mutant-skunk of the silkworm, *Bombyx mori*. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 47: 154-160 (in Japanese with English abstract).

Qian H T, 1995. Physiology and Biochemistry of Silkworm. Beijing: China Agricultural Press. 131-132. [钱惠田, 1995. 蚕的生理生化. 北京: 中国农业出版社. 131-132]

Sundaram T K, Sarma P S, 1962. Tryptophan metabolism in rice moth larva (*Corcyra cephalonicast*). *Nature*, 196: 193-194.

Shen R Q, Gu Q M, Li Y T, 1980. The Basic Biochemistry. Shanghai: Shanghai Scientech Press. 361-364. [沈仁权, 顾其敏, 李泳棠, 1980. 基础生物化学. 上海: 上海科技出版社. 361-364]

Watanabe K, Nakasone S, Horie Y, 1971. Effects of omission of essential B vitamins in each larval instar of the silkworm, *Bombyx mori* L. *J. Seric. Sci. Jpn.*, 40: 56-60 (in Japanese with English abstract).

Zhang J Y, Huang L Q, 2003. Distribution, movement and metabolism of vitamin B_6 compounds in the silkworm, *Bombyx mori*. *Acta Entomologica Sinica*, 46 (3): 277-281. [张剑韵, 黄龙全, 2003. 家蚕体内维生素 B_6 的存在形态和转换代谢. 昆虫学报, 46 (3): 277-281]